

研究简报

罗非鱼肌原纤维 ATPase 的基本性质

BASIC PROPERTIES OF MYOFIBRIL ATPASE FROM *TILAPIA* MUSCLE

叶玫 吴成业 王勤 陈冰 刘智禹

(福建省水产研究所, 厦门 361012)

YE Mei, WU Cheng-Ye, WANG Qin, CHEN Bing, LIU Zhi-Yu

(Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen 361012)

关键词 罗非鱼, 肌原纤维 ATPase

KEYWORDS *Tilapia*, myofibril ATPase

中图分类号 S965.125

肌原纤维占鱼肉蛋白总量的65%~70%,同时具有ATP水解酶的功能,是研究鱼肉蛋白质性状、判定蛋白质变性程度的重要指标。70年代开始,这个领域的研究更为广泛深入,研究内容包括肌原纤维ATPase的基本性质、热稳定性、物理化学因素(包括温度、中性盐、pH、糖类)的影响[新井1972,桥本1984],以及酶活性与水产品品质的关系等。这些研究,对水产品的保鲜加工,有十分重要的理论指导意义和实际应用价值。本文以我国近年大量发展起来的养殖罗非鱼为试样,初步探讨其肌原纤维ATPase的基本性质,拟通过这些研究,对罗非鱼的保鲜加工能有所启示。

1 材料与方 法

1.1 材 料

罗非鱼(*Tilapia*)选自厦门东渡市场活鲜鱼,即杀,取背肌备用。

1.2 实 验 方 法

(1)肌原纤维的制备。参照[新井1974]的方法,并略加改动。取即杀罗非鱼背肌50g,加入

三倍体积冰冷的0.1M KCl·20mM Tris 一顺丁烯二酸 pH 缓冲液,在10 000r/min 组织捣碎机中匀浆1分钟、停30秒,如此反复4~6次。匀浆用50目筛绢过滤,取滤液5mL,加6倍体积上述缓冲液,搅拌均匀,在2 500r/min 离心10分钟,得到沉淀物,反复3次。最后把沉淀用缓冲液溶解,定量至50mL,所得肌原纤维悬浊液置4℃下保存备用。

(2)蛋白质浓度测定按双缩脲法进行。

(3)肌原纤维 ATPase 活性的测定。将上述悬浊液(酶液)稀释至蛋白浓度2~6mg/mL,酶活力按 ATP 在酶的作用下释放出无机磷酸根的量计算。反应体系含有5mM Cl₂(或2.5mM MgCl₂),100mM KCl,10mM ATP 50mM Tris 一顺丁烯二酸 pH 缓冲液,酶液0.25mL。反应终体积5mL,反应温度30℃。以加入酶液开始计时,反应5分钟,用15%三氯醋酸终止反应。取滤液用钼酸铵定磷法在690nm 比色测定磷酸根的含量。

酶活力单位为 μmol 无机磷酸根/分钟·毫克蛋白($\mu\text{mol pi}/\text{min}\cdot\text{mg pro}$)

2 实验结果

2.1 罗非鱼肌原纤维 ATPase 的一般性质

罗非鱼 ATPase 的一般性质见表1,从表1的结果可以看出,在低浓度的 KCl 中, Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 对罗非鱼肌原纤维 ATPase 有激活作用,尤其 Mg²⁺ 的激活作用更为明显。EDTA 则表现抑制作用。而在高浓度的 KCl 中,EDTA 对其有显著的激活作用, Ca²⁺ 也有微弱的激活作用, Mg²⁺ 则表现出抑制作用。

表1 罗非鱼肌原纤维 ATPase 的一般性质

Tab. 1 The general properties of ATPase from *Tilapia myfibril*

KCl(M)	作用因子	酶活力($\mu\text{mol pi}/\text{min}\cdot\text{mg pro}$)
0.05	—	0.084
	2.5mM MgCl ₂	0.37
	2.5mM CaCl ₂	0.238
	1.0mM EDTA	0.0129
0.5	—	0.0182
	2.5mM MgCl ₂	0.0064
	2.5mM CaCl ₂	0.038
	1.0mM EDTA	0.135

2.2 pH 的影响

pH 对罗非鱼肌原纤维 ATPase 的影响情况,从图1的活力—pH 曲线看,酶活力在 pH 6.0和10.0附近各有一高峰,而在 pH 8.0附近有一低谷。

2.3 最适温度范围

图2为罗非鱼肌原纤维 ATPase 活力在不同温度下的变化曲线,从图2中可以看出该酶的最适温度在35℃附近,作用温度在10℃~35℃时酶活力缓缓上升,从35℃起酶活力则急剧下降,表现为热失活。

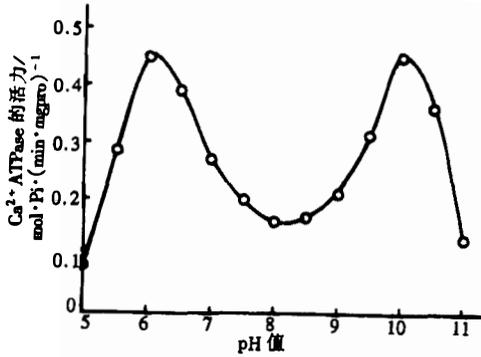


图1 pH对罗非鱼肌原纤维 Ca^{2+} -ATPase 活力的影响

Fig. 1 The influence of pH on Ca^{2+} -ATPase activity of *Tiliapia* myofibril

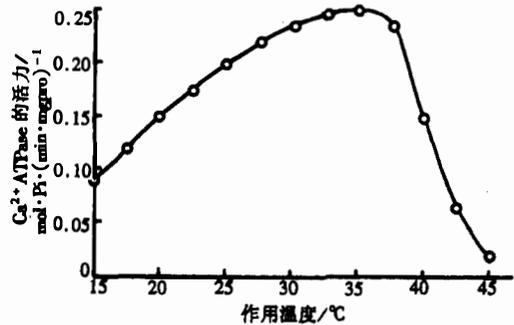


图2 温度对罗非鱼肌原纤维 Ca^{2+} -ATPase 活力的影响

Fig. 2 The influence of temperatures on Ca^{2+} -ATPase activity of *Tiliapia* myofibril

2.4 ATPase 的热失活

把罗非鱼肌原纤维悬浊液置于不同的温度下,恒温一定时间,测定其剩余活力,结果如表2所示。表2表明,随着保温温度的上升, Ca^{2+} -ATPase 的失活率升高,但与其它鱼类 ATPase 比较,罗非鱼肌原纤维 ATPase 对温度表现较高的耐受性。

表2 罗非鱼肌原纤维 Ca^{2+} -ATPase 在不同温度下的热失活

Tab. 2 The denaturation of Ca^{2+} -ATPase of *Tiliapia* Myofibril in various temperatures

恒温温度及时间	酶活力($\mu\text{mol pi}/\text{min}\cdot\text{mg pro}$)	失活率(%)
对照组	0.210	0
35°C, 60min	0.158	24.8
40°C, 30min	0.110	48.7
45°C, 10min	0.027	87.2

2.5 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对 ATPase 活力的影响

在0.1M KCl 中,不同 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度对罗非鱼肌原纤维 ATPase 活力的影响程度如图3所示。 Ca^{2+} 的浓度在0~5mM 时呈激活上升,在5~20mM 酶活力变化不大,20mM 后慢慢下降。超过60mM 后就表现出抑制作用。而 Mg^{2+} 的作用稍有不同,激活现象明显,在2.5mM 时达到最高值,抑制现象也较显著,30mM 后变明显抑制作用。

2.6 K^{+} 浓度的影响

在不同 K^{+} 浓度下,分别测定罗非鱼肌原纤维 Ca^{2+} -ATP、 Mg^{2+} -ATP 的活力。得出图4的变化曲线。如图4所示, K^{+} 浓度在0.05M 时, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 活力呈最高值。和上述的现象类似, Mg^{2+} -ATP 的激活和抑制行为较 Ca^{2+} -ATP 显著。

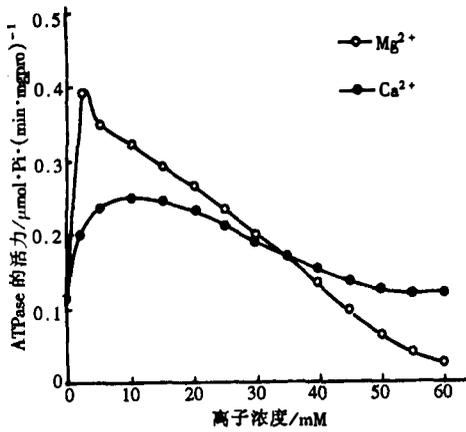


图3 在0.1M KCl 中,ATPase Ca²⁺和 Mg²⁺浓度对罗非鱼肌原纤维 ATPase 活性的影响
Fig. 3 The influence of Ca²⁺ and Mg²⁺ on ATPase activity of *Tiliapia* myofibril in the presence of 0.1m KCl

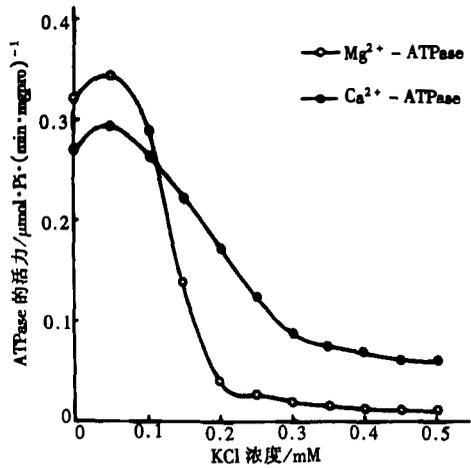


图4 KCl 浓度对罗非鱼肌原纤维 ATPase 活性的影响
Fig. 4 The influence of KCL on ATPase activity of *Tiliapia* myofibril

2.7 在不同 pH 缓冲液中 Ca²⁺ - ATP 活性变化

将罗非鱼肌原纤维悬浊液保存在4℃的不同 pH(6.0~9.0)的缓冲液中,观察贮存过程中其活性变化,结果如表3所示。初期阶段,活力基本不变,有的还略有回升现象。5天后活力慢慢下降。从最终结果看,贮存在 pH 7.0条件下,酶的剩余活力最高,为85.9%;其次是微酸性(pH 6.0),剩余活力为57.1%,碱性环境下最差,剩余活力仅为44.4%。

表3 贮存在4℃的不同 pH 缓冲溶液中罗非鱼肌原纤维 Ca²⁺ - ATPase 活性变化

Tab. 3 The effect of varlous pH on the denaturation of myofibril Ca²⁺ - ATPase from *Tiliapia* at 4℃

悬浊液 pH	冰藏时间(天)				
	0	1	5	10	15
	剩余活力(%)				
6.0	100	98.9	80.6	69.9	57.1
7.0	100	101.6	92.4	75.1	85.9
8.0	100	96.7	69.5	56.4	50.7
9.0	100	107.0	83.0	71.0	44.4

3 讨论

肌原纤维 ATPase 活性,很容易受到离子强度、pH、温度的影响,研究肌原纤维 ATPase 的基本性质,选择严格的条件来测定其活性,可以反映出鱼肉蛋白质的特定性质,判定其变化程度。从上述的实验结果看,罗非鱼肌原纤维 ATPase 的基本性质和其它水产动物的肌原纤维 ATPase 的性质类似。现就笔者的观点作讨论。

3.1 有关温度的影响

罗非鱼肌原纤维 ATPase 的最适温度比较高,在35℃附近。从热失活的行为看,罗非鱼肌

原纤维 ATPase 对温度表现出较高的耐受性。桥本[1981]比较罗非鱼、阿拉斯加绿鳕等数十种鱼类的热失活常数后指出,鱼类肌原纤维 ATPase 的热稳定性与其栖息的环境温度相适应,热带鱼比寒带鱼、中上层鱼比深海鱼有较高的热稳定性。尽管如此,温度仍是鱼肉品质下降的重要因素之一。

3.2 有关中性盐的影响

盐浓度对酶的影响遵循盐对蛋白质影响的普遍规律,盐离子和活性中心的基团结合,对肌原纤维 ATPase 起激活作用。本实验中, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对罗非鱼的肌原纤维 ATPase 起激活作用,在0.1M KCl 存在下, Mg^{2+} 的激活水平明显高于 Ca^{2+} ,这与加藤[1977]对鲤等的肌原纤维 ATPase 激活行为的研究结果相似。在肌原纤维 ATPase 基本性质的研究中,以中性盐,特别是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 等对其影响的研究最多。实际上, Mg^{2+} -ATPase 或 Ca^{2+} -ATPase 已成为追踪鱼肉蛋白质变性程度的指标。加藤[1979]的另一项研究表明,冷冻鱼糜的 Mg^{2+} -ATPase 或 Ca^{2+} -ATPase 的活性和鱼糜的凝胶强度有一定的对应关系,肌原纤维 Ca^{2+} -ATPase (Mg^{2+} -ATPase)可作为判定冷冻鱼糜等级的指标。

3.3 pH 的作用

鱼类在正常的生理状态下,肌肉充氧,pH 在近中性(pH 7.2左右),死亡后由于缺氧,糖元分解产生乳酸而使 pH 下降到5.4~6.4之间。而后随着自身酶解自溶和细菌作用,含氮物质分解而使 pH 回升。桥本[1984]的研究指出,pH 是影响肌肉中肌原纤维蛋白质稳定性的重要因素,pH 在中性时,鱼肉蛋白质最为稳定,而在偏酸或偏碱时,鱼热的热变性和冷冻变性的速度明显增大。从我们的实验结果,在 pH 7的缓冲液中贮存,酶保持较高的活性,也证明了这一点。

综上所述,由于肌原纤维占鱼肉蛋白质的大部分,与鱼肉在贮藏、处理加工中物性变化关系密切。因此,研究鱼类肌原纤维 ATPase 的性质,摸清其特性,对鱼肉贮藏加工过程中采取降低温度、调整 pH、添加或除去某种离子等措施,能有效地缓解鱼热的热变性和冷冻变性,减轻鱼肉蛋白质的不良变化,这对提高水产品质量有很大意义。

参 考 文 献

- 加藤登. 1977. 魚類筋原纖維 ATPaseの生化学研究. 日本水産學會誌,43(7):857~867
加藤登. 1979. スケトウグラ冷凍すり身の——新品質判定法. 日本水産學會誌,45(8):1027~1032
桥本昭彦. 1981. 魚類筋原纖維 Ca^{2+} -ATPase 活性の温度安定性と環境適應. 日本水産學會誌,48(5)671~684
桥本昭彦. 1985. 各種魚類の筋原纖維 Ca^{2+} -ATPaseの変性速度に及ぼすpHと温度の影響,日本水産學會誌,51(1)99~105
新井健一. 1972. コイ筋肉アクトミオシンATPaseの熱変性について,日本水産學會誌,39(6):625~631
新井健一. 1974. 魚類筋肉クンパク質の特性の測定,水産生物化学・食品学実験書. 恒星社厚生閣版. 189~202